

研究报告

A Letter

斑鳊 myostatin 基因及其启动子的克隆与序列分析

孙科军^{1,2}, 刘希良¹, 王开卓¹, 陈敦学¹, 褚武英¹, 陈韬², 张建社¹, 成嘉¹

1. 长沙学院生物工程与环境科学系, 长沙, 410003

2. 湖南农业大学动物医学院, 长沙, 410128

✉ 通讯作者: chengjia119911@126.com ✉ 作者

水生生物研究, 2012 年, 第 1 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/aor.cn.2012.01.0002

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 2 期 133-140 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

孙科军等, 2012, 斑鳊 myostatin 基因及其启动子的克隆与序列分析, 水生生物研究 Vol.2 No.2 pp.7-13 (doi: 10.5376/aor.cn.2012.01.0002)

引用格式(英文):

Sun et al., 2012, Cloning and Sequence Analysis of the Myostatin Gene and its Promoter in Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*), Shuisheng Shengwu Yanjiu (Aquatic Organism Research) Vol.1 No.2 pp.7-13 (doi: 10.5376/aor.cn.2012.01.0002)

摘要 采用 Tail-PCR 和常规 PCR 技术首次克隆出斑鳊 myostatin 基因及其启动子序列。经生物信息学分析发现, 斑鳊 myostatin 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码区 1 131 bp, 共编码 376 个氨基酸。斑鳊 myostatin 启动子区域大小为 840 bp, 存在 1 个 TATAA-box、4 个 E-box 和 1 个 CAAT-box 作用元件。利用软件 CLUSTALW 和 MEGA3.1 构建 14 种硬骨鱼的 myostatin 启动子的系统进化树结果表明: 斑鳊同大口黑鲈亲缘关系最近, 与鲤鱼和鳊野鲮亲缘关系较远, 其结果与传统形态学分类中的亲缘关系一致。斑鳊 myostatin 基因及其启动子克隆与特征分析, 将为进一步研究鱼类 myostatin 基因的表达调控及其功能分析提供参考。

关键词 斑鳊; 肌肉生长抑制素; 启动子; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the Myostatin Gene and its Promoter in Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)

Sun Kejun^{1,2}, Liu Xiliang¹, Wang Kaizhuo¹, Chen Dunxue¹, Chu Wuying¹, Chen Tao², Zhang Jianshe¹, Cheng Jia¹

1. Department of Bioengineering and Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003

2. Veterinary Faculty, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128

✉ Corresponding author, chengjia119911@126.com; ✉ Authors

Abstract The sequences of myostatin gene and its promoter in Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*), for the first time, were cloned through the conventional PCR and Tail-PCR technology. Bioinformatics analysis shows that the myostatin gene consists of three exons and two introns and the coding region is 1 131 bp encoding 376 amino acid residues. The nucleotide sequence analysis shows that myostatin promoter is 840bp and contains several regulatory elements, such as one TATAA-box, four E-boxes and one CAAT-box. The phylogenetic tree of the myostatin gene promoters from 14 teleost species was constructed with CLUSTALW and MEGA3.1. The result indicates that Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*) has a closer phylogenetic relationship with Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), but it is far from *Cyprinus carpio* and *Labeo fimbriatus*. This result is consistent with general morphological taxonomy. This study would contribute to the further research on the regulation of myostatin expression and the function of myostatin in teleost fish.

Keywords Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*); Myostatin; Promoter; Tail-PCR

研究背景

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)基因是 McPherron 和 Lee (1997)在研究 TGF- β (transforming growth factor- β)家族时, 用该家族基因保守序列设计简并性引物对小鼠 cDNA 文库进行扩增得到的一个新基因。编码 376 个氨基酸, 具有 TGF- β 超家族的典型结构, 但与其它 TGF- β 家族成员的同源性很低, 因而被归为新一类: GDF-8 (Mcpherron et al.,

1997)。Myostatin 基因主要在动物骨骼肌中特异性表达并对肌肉的生长发育起到负调控作用(Rios et al., 2004)。超量表达可以导致动物肌肉萎缩, 而其突变则使动物产生双肌现象(Mcpherron et al., 1997; Schuelke et al., 2004)。实验发现, 将重组人 myostatin 蛋白载体肌注于裸鼠后腿, 可导致肌肉和脂肪显著减少(Zimmers et al., 2002)。而敲除 myostatin 基因的小鼠肌肉质量会显著增加(Welle et al., 2007)。而定

向敲除 *myostatin* 基因可明显抑制由糖皮质激素诱发的肌肉萎缩(Gonzalez-Cadavid et al., 1998)。由近来的研究可知, 与 *myostatin* 基因编码区相比, *myostatin* 基因的启动子区域序列不同物种间差异较高, 意味着 *myostatin* 基因的转录调控模式在不同物种间可能存在着差异(Gu et al., 2004; Du et al., 2005; Yu et al., 2005)。有少数研究对人、鼠和牛等 *myostatin* 基因启动子进行了探讨, 发现一些转录因子(如 MyoD, Smad, FoxO 和 MEF-2)对 *myostatin* 基因的转录和表达起到调控作用(Ma et al., 2001; Spiller et al., 2002; Crisa et al., 2003; Salerno et al., 2004; Forbes et al., 2006; Allen and Unterman, 2007), 然而, 这方面仍有许多未知领域有待进一步研究。

目前已有较多鱼类的 *myostatin* 的研究, 比如: 采用 RNAi 途径, 给斑马鱼(*Danio rerio*)受精卵注射 *myostatin* 的 C 末端 dsRNA, 导致斑马鱼早期胚胎的增生或肥大(Acosta et al., 2005); 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)经外源糖皮质激素处理 12 h 后, *myostatin* 的表达下降(Rodgers et al., 2003); 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) *myostatin* 前体蛋白在生长激素处理后升高(Weber et al., 2005); 转 GH (生长激素) 基因大麻哈鱼(*Salmo salar*)白肌组织也具有较高的 *myostatin* 前体水平等(Biga et al., 2004)。Myostatin 作为一种肌肉生长的负性调控因子, 通过对该基因进行遗传改造, 在渔业方面有着广阔的商业前景。斑鳊俗称花桂或黑桂, 隶属于鲈形目(Perciformes)、鳊亚科(Sinipercae)、鳊属(*Siniperca*), 是我国著名的淡水经济鱼类, 其肉质鲜美, 口感细腻, 富含不饱和脂肪酸, 有“淡水石斑”之称(符贵红等, 2008)。与翘嘴鳊和大眼鳊等常见的鳊鱼养殖品种相比, 斑鳊虽生长周期较长, 但其粗蛋白含量高, 脂肪和灰分较低, 整体营养价值和肉质品质较高, 且疾病少、抗病能力强, 具有较大的经济价值和应用前景(苏胜齐等, 2005)。本研究通过对斑鳊 *myostatin* 启动子, 编码区和非编码区的克隆及其结构特征的初步分析, 为进一步研究斑鳊肌肉生长和发育调控奠定基础。

1 结果与分析

1.1 斑鳊 *myostatin* 结构基因和启动子序列片段 PCR 扩增

以斑鳊白肌基因组DNA为模板, 分别经三轮 Tail-PCR 和两组常规 PCR 反应来克隆 *myostatin* 的启动子和 *myostatin* 的结构基因片段。PCR 产物经的 1% 琼脂凝胶电泳检测, 最终得到的一个约 1 kb 大小的

上游调控序列及两条分别约为 2 kb 和 1 kb 的结构基因片段(图1)。

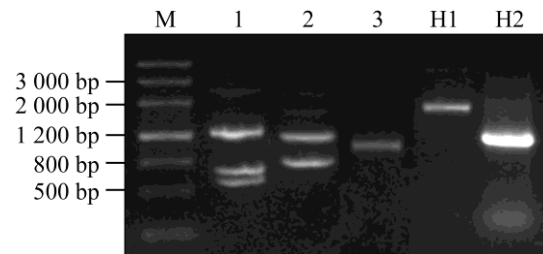


图1 斑鳊 *myostatin* 基因和启动子 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳注: M: DNA MarkerIII (天根公司); 1st: 第一轮反应结果; 2nd: 第二轮反应结果; 3rd: 第三轮反应结果; H1: F1 和 R1 为引物的 PCR 反应结果; H2: F2 和 R2 为引物的 PCR 反应结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of *myostatin* structural gene and promoter from Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)

Note: M: DNA MarkerIII (TIANGEN); 1st: The first amplification product; 2nd: The second amplification product; 3rd: The third amplification product; H1: The PCR product of F1 and R1; H2: The PCR product of F2 and R2

1.2 PCR 产物测序

将 PCR 产物纯化回收, 测序, 然后将 3 个片段的测序结果进行拼接, 得到一个 3 228 bp 的片段, 其中上游调控序列长 868 bp, 结构基因长 2 360 bp, 结构基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 外显子大小依次为 379 bp、371 bp 和 381 bp; 内含子大小分别为 395 bp 和 830 bp。外显子总长为 1 131 bp, 共编码 376 个氨基酸(图 2)。氨基酸序列分析表明, 编码的氨基酸分子量大小为 42.55 kD, 等电点 pI 为 5.55, 氨基酸整体偏酸性。

1.3 启动子序列系统进化分析

从 Genebank 中查询得到大口黑鲈、斑马鱼、虹鳟鱼、大黄鱼、花鲈、黄鳍棘鲷、鲤鱼、缨野鲮、尖吻鲈、尼罗尖吻鲈、大鳞大麻哈鱼、金头鲷、比氏骨鲷共 13 种鱼的 *myostatin* 的启动子序列, 通过与本实验克隆出来的斑鳊 *myostatin* 启动子进行比对。然后利用 CLUSTALW 和 MEGA3.1 软件 N-J 法构件系统发育树(图 3), bootstrap 自举值取 1 000 次, 显示不同种属鱼类的进化及亲缘关系。

由图 3 表明: 斑鳊、大口黑鲈、大黄鱼、花鲈、黄鳍棘鲷、尖吻鲈、尼罗尖吻鲈、金头鲷、比氏骨鲷这几种鲈形目鲈亚目鱼类在一个大的分支上, 斑鳊与大口黑鲈的亲缘性最近; 属于鲤形目鲤科的鲤鱼、缨野鲮、比氏骨鲷以及属于鲑形

目鲑科的虹鳟鱼、大鳞大麻哈鱼分别在另两个大的分支上。图中 myostatin 启动子进化树所表明的鱼类亲缘关系及其本身的分类地位, 与传统形态学分类结果相一致。

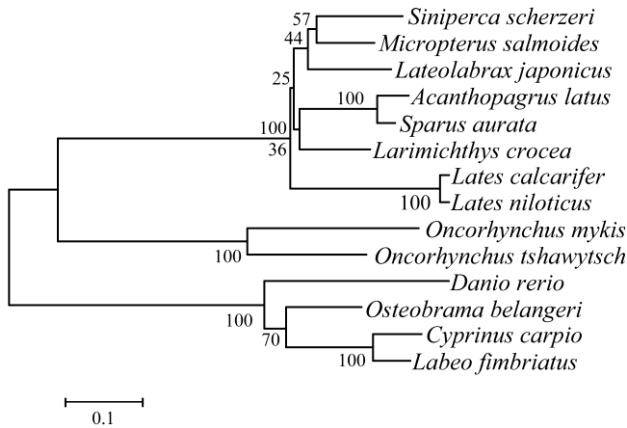


图 3 14 种鱼类 myostatin 启动子序列的 NJ 系统进化树

注: 大口黑鲈: EF071854; 斑马鱼: AY323521; 虹鳟鱼: DQ138300; 大黄花: AY842934; 花鲈: AY965685; 鲤鱼: GU014395; 缨野鲮: HQ850576; 尖吻鲈: EF672685; 尼罗尖吻鲈: EF681885; 金头鲷: EU881511; 黄鳍棘鲷: HM368446; 比氏骨鲮: HQ850577; 大鳞大麻哈鱼: EU009954

Figure 3 The NJ phylogenetic tree of the myostatin promoter sequences from 14 kinds of fishes

Note: *Micropterus salmoides*: EF071854; *Danio rerio*: AY323521; *Oncorhynchus mykiss*: DQ138300; *Larimichthys crocea*: AY842934; *Lateolabrax japonicus*: AY965685; *Cyprinus carpio*: GU014395; *Labeo fimbriatus*: HQ850576; *Lates calcarifer*: EF672685; *Lates niloticus*: EF681885; *Sparus aurata*: EU881511; *Osteobrama belangeri*: HQ850577; *Acanthopagrus latus*: HM368446; *Oncorhynchus tshawytscha*: EU009954

2 讨论

Tail-PCR 是一种用来克隆已知序列两端的未知序列的新方法, 特异性高, 重复性好, 能快速获得目标片段。避免了基因组步行法对高质量基因组 DNA 的要求, 与普通 PCR 一样, 可以使用低质量的基因组 DNA 做模板。本试验利用 Tail-PCR 的方法克隆出斑鳊 myostatin 的上游调控序列, 长度约为 860 bp。PLACE 预测结果显示, 该基因上游调控区除含有一个核心启动序列(732~781 bp)外, 还有 I-box (156~160 bp)、TATAA box (730~744 bp)、CAAT-box (698~701 bp)及 4 个 E-box (26~31 bp, 287~292 bp, 589~594 bp, 608~613 bp)等启动子特征性调控元件的存在。进一步分析表明: 斑鳊 E-box3 是 MyoD 转录因子结合位点, MyoD 可通过与 E-box 结合调

控其下游靶基因 myostatin 的转录和表达, 对肌肉的生长发育有着重要的调控作用(Langley et al., 2002; Østbye et al., 2007)。作为 MyoD 家族转录因子结合位点的 E-box 元件同样在斑马鱼(Xu et al., 2003)、石斑鱼(Chen et al., 2007)、虹鳟(Garikipati et al., 2006)、花鲈(Ye et al., 2007)、大西洋鲑(Østbye et al., 2007)等硬骨鱼的 myostatin 启动子序列中被发现。调控序列中的 CAAT-box 元件可极大提高基本启动子的转录效率(孙晓红等, 2002), 对 myostatin 基因的转录水平也有着较大的影响。

对 myostatin 启动子的进化分析表明: 斑鳊 myostatin 启动子与其它 13 种鱼亲缘关系的远近和本身的分类学地位, 与传统形态学分类结果相一致。由此我们可以假设, 启动子的变化与物种的进化有着相关性, 启动子通过碱基变化来改变结构基因的转录水平从而促使物种向着与启动子作用相关的方向进化。

DNA 序列分析表明, 克隆得到的斑鳊 myostatin 结构基因长 2 360 bp, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 外显子大小依次为 379 bp、371 bp 和 381 bp; 内含 I 和内含子 II 大小分别为 395 bp 和 830 bp。两个内含子都以 GT 开始、AG 结尾, 符合内含子的 GT-AG 剪接规则。进一步分析发现: 内含子 I 序列中有 2 个 CAAT-box, 内含子 II 序列中有 1 个 TATAA-box, 5 个 CAAT-box 等类似启动子调控元件, 推测斑鳊 myostatin 基因内含子可能具有增强该基因转录的功能。同样, 典型的调控元件 CAAT 和 TATAA-box 序列也分别在鳊 β -actin 基因内含子 1 和准噶尔雅罗鱼 β -actin 基因的第 1 个内含子中被发现, 预示着这些内含子可能作为相应基因启动子的一部分在起始转录表达中有着重要作用(张殿昌等, 2007; 胡文革等, 2010)。

斑鳊 myostatin 基因推导的氨基酸序列显示: 该蛋白在 22~23 位氨基酸之间存在一个信号肽切割位点, 264~267 位氨基酸处有 RARR (与 RXXR 相一致)蛋白酶解的加工位点。与其它 TGF- β 超家族成员蛋白一样, myostatin 蛋白以前体形式存在, 切除信号肽后, 在 RXXR 位点经蛋白酶水解加工, 形成 N 端编码前肽和 C 端生物活性区(Lee and McPherron, 2001)。斑鳊 myostatin 氨基酸序列 C 端生物活性区的保守性很高, 其中有 9 个异常保守的半胱氨酸, 它们以二硫键形式连接形成的“cysteine knot”结构可能与 myostatin 蛋白及其它 TGF- β 超家

族成员共有的蛋白稳定性及高导热性直接相关(Muller et al., 2002; Barth et al., 2003)。

与哺乳动物相比, 虹鳟鱼、大西洋鲑鱼、罗非鱼和石鲈鱼等硬骨鱼类的 myostatin 基因有两种类型(即 myostatin-I 和 myostatin-II) (Østbye et al., 2001; Rodgers et al., 2003; Garikipati et al., 2007)。本实验克隆的 myostatin 基因与这些鱼类的 myostatin-I 同源性较高, 而斑鳅中是否有第二种 myostatin 基因类型的存在还有待进一步研究。许多研究表明: myostatin 基因是哺乳动物肌肉发育中重要的负性调控因子, 仅在骨骼肌中特异性表达; 而鱼类的 myostatin 基因在除骨骼肌外的多种组织(如: 脑, 心, 肾, 眼, 肠等)中广泛表达, 因此, 可推测鱼类 myostatin 基因的作用可能不仅仅局限于抑制其肌肉的生长发育, 还可对鱼类神经系统的发育等多方面产生广泛影响(Garikipati et al., 2007)。本研究对斑鳅 myostatin 基因及启动子进行了克隆及初步的生物信息学分析, 为进一步研究斑鳅 myostatin 基因的功能及其启动子的调节机制提供了有益的参考。

3 材料与方法

3.1 试验材料和试剂

鲜活斑鳅(*Siniperca scherzeri*)购于长沙西长街特种水产品市场, 解剖获取鱼背部肌肉, 提取基因组 DNA 用于 myostatin 的克隆。

OMEGA Mini Plasmid Kit、Gel Extraction Kit、TaKaRa TaqTM PCR 试剂盒(购自宝生物有限公司); DNA mark、PMD18-T 载体、top10 感受态细胞(购自天根生化科技有限公司)。

3.2 白肌基因组 DNA 的提取

称取 0.2 g 斑鳅的白肌, 尽量剪碎, 加入 1 mL

裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA; 400 mmol/L NaCl; 1% SDS)于玻璃匀浆器中研磨均匀。吸取 500 μ L 匀浆液, 加入半粒黄豆大的蛋白酶 K, 摇匀, 56 $^{\circ}$ C 消化 2~3 h。裂解物分别用等体积的饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提 1 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 和两倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清。70%乙醇漂洗两次, 离心, 弃废液, 干燥。最后用 100 μ L 无菌去离子水溶解。

3.3 引物设计和合成

根据 Genbank 中与斑鳅亲缘性较近物种的 myostatin 基因序列的比较, 设计简并引物 AD1 和特异性引物 Sp1、Sp2 及 Sp3 扩增斑鳅 myostatin 的启动子。引物 F1 和 R1, F2 和 R2 用于扩增 MSTN 基因的部分序列, 再拼接成一个长片段。所用的引物(表1)均由博尚生物公司合成。

3.4 Myostatin 基因和启动子的克隆

AD1 为 14 bp 的简并引物, 以斑鳅白肌基因组 DNA 为模板与下游引物 SP1 进行第一轮扩增, 然后以 1 μ L 第一轮产物为模板与下游引物 SP2 进行第二轮扩增, 最后以 1 μ L 第二轮产物继续与下游引物 SP3 进行第三轮扩增, 得到第三轮产物(PCR 程序如表2)。以斑鳅基因组 DNA 为模板, F1 和 R1 为引物进行扩增, 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。以 F2 和 R2 为引物, 斑鳅基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。

表 1 引物序列及退火温度

Table 1 Nucleotide sequences and annealing temperature of oligonucleotide primers

引物 Primer	引物序列(5'→3') Nucleotides sequence (5'→3')	退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature ($^{\circ}$ C)
AD1	CGATGGCRCYRTC�	42
SP1	CATTATTGTCTCCGTGATGGCA	60
SP2	CTGGTGCCTCTCTTGGTCAC	58
SP3	GTTTGGATTAATGTCCCACAC	58
F1	AGACAATGCATCTCTCTCAGAT	56
R1	CTTCACCTCCATGAATGGTTG	56
F2	ACTGGGGCATCGAGATTAACG	58
R2	CAACTCAAGGCATCCACAACG	58

表 2 Tail-PCR 反应程序

Table 2 Procedure of Tail-PCR

反应	程序号	循环数	反应条件
Reaction	File No.	Cycle No.	Thermal condition
第一轮	1	1	92°C 3 min; 95°C 1 min
1 st amplification	2	5	94°C 30 s; 60°C 1 min; 72°C 2 min 30s
	3	1	94°C 30 s; 28°C 2 min, ramping to 72°C 0.3°C/s; 72°C 2 min
	4	10	94°C 30 s; 42°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
	5	1	94°C 30 s; 60°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
	6	14	94°C 30 s; 60°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
			94°C 30 s; 42°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
	7	1	72°C 5 min
第二轮	1	1	92°C 3 min; 95°C 1 min
2 nd amplification	8	15	94°C 30 s; 58°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
			94°C 30 s; 58°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
			94°C 30 s; 58°C 1 min; 72°C 2 min 30 s
第三轮	7	1	72°C 5 min
3 rd amplification			同第二轮(The same with secondary)

3.5 PCR 产物的回收和测序

以上 PCR 产物经 1% 的琼脂胶电泳分离, 切下目的条带, 用 OMEGA Gel Extraction Kit 试剂盒回收。纯化产物连接至 PGM-18T 载体, 转化到 top10 感受态细胞中, 菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒, 送博尚生物公司测序。

3.6 序列的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件进行核苷酸及氨基酸序列分析, 由 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 预测启动子调控元件及转录起始位点。Splign (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>) 进行内含子分析。

作者贡献

孙科军是本研究的试验执行者, 完成了采样、基因克隆、数据分析以及论文初稿的撰写与修改; 刘希良、王开卓和陈敦学参与了试验的采样和数据分析工作; 陈韬和张建社为本研究立意指导; 成嘉和褚武英参与本研究的实验设计、论文修改。

致谢

感谢孙志良教授的精心指导和大力支持。

参考文献

Acosta J., Carpio Y., Borroto I., Gonzalez O., and Estrada M.P., 2005, Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype, *J. Biotechnol.*, 199119(4): 324-331

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.023> PMID: 16005092

Allen D.L., and Unterman T.G., 2007, Regulation of myostatin expression and myoblast by FoxO and SMAD transcription factors, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 292(1): C188-C199 <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00542.2005> PMID:16885393

Barth D., Kyrieleis O., Frank S., Renner C., and Moroder L., 2003, The role of cysteine knots in collagen folding and stability, partII. Conformational properties of (Pro-Hyp-Gly) model trimers with N-and C-terminal collagen typeIII cysteine knots, *Chemistry*, 9(15): 3703-3714 <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200304918> PMID:12898697

Biga P.R., Schelling G.T., Hardy R.W., Cain K.D., Overturf K., and Ott T.L., 2004, Growth hormone differentially regulates muscle myostatin-1 and-2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Gen. Comp. Endocnn.*, 135(3) 324-333 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.10.014> PMID:14723884

Chen Y.M., Wei C.Y., Chien C.H., Chang H.W., Huang S.I., Yang H.L., and Chen T.Y., 2007, Myostatin gene organization and nodavirus-influenced expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), *Comp. Biochem. Physiol., Part D*, 2(3): 215-227

Crisa A., Marchitelli C., Savarese M.C., and Valentini A., 2003, Sequence analysis of myostatin promoter in cattle, *Cytogenet Genome Res.*, 102(1-4): 48-52 <http://dx.doi.org/10.1002/cyg.102>

- org/10.1159/000075724
- Du R., Chen Y.F., An X.R., Yang X.Y., Ma Y., Zhang L., Yuan X.L., Chen L.M., and Qin J., 2005, Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep, *DNA Seq.*, 16(6): 412-417 <http://dx.doi.org/10.1080/10425170500226474> PMID:16287620
- Forbes D., Jackman M., Bishop A., Thomas M., Kambadur R., and Sharma M., 2006, Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism, *J. Cell Physiol.*, 206(1): 264-272 <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20477> PMID:16110474
- Fu G.H., Chu W.Y., Cheng J., Liu F., Liu Z., and Zhang J.S., 2008, Analysis on nutritional components in muscle of *Siniperca kneri* and *Siniperca scherzri*, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 36(34): 10522-10523, 15026 (符贵红, 褚武英, 成嘉, 刘芳, 刘臻, 张建社, 2008, 大眼鲮和斑鲮肌肉营养成分分析, *安徽农业科学*, 36(34): 10522-10523, 15026)
- Garikipati D.K., Gahr S.A., and Rodgers B.D., 2006, Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout Myostatin-1a and myostatin-1b genes, *Journal of Endocrinology*, 190(3): 879-888 <http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06866> PMID:17003288
- Garikipati D.K., Gahr S.A., Roalson E.H., and Rodgers B.D., 2007, Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic organization, differential expression, and pseudogenization, *Endocrinology*, 148(5): 2106-2115 <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1299> PMID:17289851
- Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen K.Q., Lalani R., Asa S., Mamitam M., Nair G., Arver S., and Bhasin S., 1998, Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(25): 14938-14943 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.25.14938>
- Gu Z., Zhang Y., Shi P., Zhang Y.P., Zhu D., and Li H., 2004, Comparison of avian myostatin genes, *Anim. Genet.*, 35(6): 470-472
- Hu W.G., Chen C.F., Wang Y.Z., Hao F.X., Cao X.D., and Sheng J.L., 2010, Cloning and sequence analysis of the β -actin gene promoter region of *Leuciscus merzbacheri*, *Dongwuxue Zazhi (Chinese Journal of Zoology)*, 45(1): 18-26 (胡文革, 陈创夫, 王远志, 郝凤霞, 曹旭东, 盛金良, 2010, 准噶尔雅罗鱼 β -肌动蛋白基因启动子克隆及序列分析, *动物学杂志*, 45(1): 18-26) <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01194.x> PMID: 15566475
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., and Kambadur R., 2002, Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression, *J. Biol. Chem.*, 277: 49831-49840 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M204291200> PMID:12244043
- Lee S.J., and McPherron A.C., 2001, Regulation of myostatin activity and muscle growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(16): 9306-9311 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.151270098> PMID:11459935 PMID:55416
- Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N., and Bhasin S., 2001, Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene regulation by dexamethasone in vitro, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(6): E1128-E1136 PMID:11701425
- McPherron A.C., Lawler A.M., and Lee S.J., 1997, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member, *Nature*, 387(6628): 83-90 <http://dx.doi.org/10.1038/387083a0> PMID:9139826
- McPherron A.C., and Lee S.J., 1997, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94(23): 12457-12461 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>
- Muller Y.A., Heiring C., Misselwitz R., Welfle K., and Welfle H., 2002, The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.*, 277(45): 43410-43416 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206438200> PMID:12207021
- Østbye T.K., Galloway T.F., Nielsen C., Gabestad I., Bardal T., and Andersen Ø., 2001, The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues, *Eur. J. Biochem.*, 268 (20): 5249-5257 <http://dx.doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02456.x>
- Østbye T.K., Wetten O.F., Tooming-Klunderud A., Jakobsen K.S., Yafe A., Etzioni S., Moen T., and Andersen Ø., 2007, Myostatin (MSTN) gene duplication in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost myostatin-1 and-2, *Gene*, 403(1-2): 159-169 <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.008> PMID:17890020
- R ós R., Fernández-Nocelos S., Carneiro I., Arace V.M., and Deversa J., 2004, Differential response to exogenous and endogenous myostatin in myoblasts suggests myostatin acts as an autocrine factor in vivo, *Endocrinology*, 145(6): 2795-2803 <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1166> PMID: 14976141
- Rodgers B.D., Weber G.M., Kelley K.M., and Levine M.A., 2003, Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284(5): R1277-R1286

- Salerno M.S., Thomas M., Forbes D., Watson T., Kambadur R., and Sharma M., 2004, Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287(4): C1031-1040 <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00492.2003> PMID:15189813
- Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E., Hübner C., Riebel T., Kömen W., Braun T., Tobin J.F., and Lee J., 2004, Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child, *N. Engl. J. Med.*, 350(26): 2682-2688 <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa040933> PMID:15215484
- Spiller M.P., Kambadur R., Jeanplong F., Thomas M., Martyn J.K., Bass J.J., and Sharma M., 2002, The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD, *Mol. Cell Biol.*, 22(20): 7066-7082 <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.20.7066-7082.2002> PMID:12242286 PMCid:139803
- Su S.Q., Zhang H.Q., He Z.Y., and Zhang Z.X., 2005, A comparative study of the nutrients and amino acid composition of the muscle of *Siniperca chuatsi* and *S. Scherzeri*, *Xinan Nongye Daxue Xuebao (Ziranhexue Ban) (Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science))*, (6): 898-901 (苏胜齐, 张海琪, 何中央, 张祖兴, 2005, 翘嘴鲌和斑鲌肌肉营养成分及氨基酸组成比较, *西南农业大学学报(自然科学版)*, (6): 898-901)
- Sun X.H., Li M.J., and Pan Y.J., 2002, A brief account of promoter cloning, *Shijun Xuebao (Acta Edulis Fungi)*, 9(3): 57-62 (孙晓红, 李明杰, 潘迎捷, 2002, 启动子克隆概述, *食用菌学报*, 9(3): 57-62)
- Weber T.E., Small B.C., and Bosworth B.G., 2005, Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Domestic Animal Endocrinology*, 28(1): 64-73 <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.05.005> PMID:15620807
- Welle S., Bhatt K., Pinkert C.A., Tawil R., and Thornton C.A., 2007, Muscle growth after Post-developmental myostatin gene knockout, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 292(4): E985-E991 <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00531.2006> PMID:17148752
- Xu C., Wu G., Zohar Y., and Du S.J., 2003, Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish, *J. Exp. Biol.*, 206: 4067-4079 <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00635> PMID:14555747
- Ye H.Q., Chen S.L., Sha Z.X., and Liu Y., 2007, Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*), *Mar. Biotechnol. (NY)*, 9(2): 262-272 <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-006-6093-6> PMID:17308997
- Yu Z.Q., Meng Q.Y., Yuan L., Zhao Z.H., Li W., Hu X.X., Yan B.X., Fan B.L., Yu S.Y., and Li N., 2005, Comparative analysis of the pig BAC sequence involved in the regulation of myostatin gene, *Science in China Series C, Life Sciences*, 48(2): 168-180 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02879670> PMID:15986890 <http://dx.doi.org/10.1360/03yc0217> PMID:15986890
- Zhang D.C., Shao Y.Q., Su T.F., and Jiang S.G., 2007, Analysis of genomic structure and promoter characterization of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) β -actin gene, *Journal of Fishery Sciences of China*, 14(3): 345-351 (张殿昌, 邵艳卿, 苏天凤, 江世贵, 2007, 鲢 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析, *中国水产科学*, 14(3): 345-351)
- Zimmers T.A., Davies M.V., Koniari L.G., Haynes P., Esquela A.F., Tomkinson K.V., Mcpherrom K.A., Wolfman N.M., and Lee S.J., 2002, Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin, *Science*, 296(5572): 1486-1488 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069525> PMID:12029139

TTGCCACACGATGGCACTATCTTCTCATGTGCTGCAACCAGGTTTCAGCAACAAGGATTT
E-box4
61 GGACTAAGCATTTCCTTTATCTTTGCTGACTTTTTTTTAATTTTTTATTCTGTACGGGA
121 GACGATGTATTACCGTTTGTGGTTTTACATGAGCCGATAATCAGCTTCTCAGAAGGGAAC
I-box
181 CTGGTCTAAACAGACGACACCTAGAGAAGGACTTGACTTGCACTGGAGAAAAGTGTAACT
241 CTTATTTTCCTCAAGGATGAAATGTATTTGCACAACCAGGCAGACA CAGCTGCATCCATG
E-box3
301 TCCCTGTCATTAAGACAATTAATGTTTGACGGACTTATCGTGCCCGCAGTTAAAAAGTT
361 TCCTTTGTTTTCTTTGGAACTAAATGTATTCACAGCACAACTGCACACGAAGTCGCAC
421 ATCTTGCTGTCTTCATGATATGCAGCAGGCTCTGTAGCCTAAGCTGTTTGTGTGTAGT
481 TTTGATCTGGGCTGATTGAGGTGCATCAGGGCGTTCCATATAACACAACAGTCCGGTCTG
541 CGCCCCTCCCCTCACTGCGCAGTCACTGCAAGAAAAGTGAATTTATC CATCTGTGGACA
E-box2
601 CGTTCCG CACATGCTCACAGTCTCCGTCCCTTTATGGTTTGACAACGAAAAAAGTTTTC
E-box1
661 ATGTCAGTCGGTTAAAATTCATTGTTGCCTGTCCAGC CAATCATAGTTTTTGACGACACA
CAAT-box
721 AAAGAGGCTAAAGTTGGAGTATAAAAAGGTGTGCGCTAATAAAGTATGATGCCTATCAGT
TATA box
781 GTGGGACATTAATCCAAACCCAGTCCAGTCGCCTATCAGGTCCAGCACACACCAAGGGAT
841 CTTTTGTAACCTCACACCTTAGAGACAATGCATCTCTCAGATTGTGCTGTATCTTAG
1 M H L S Q I V L Y L S
901 CTTGCTGCTTGCTTTGGGTCCAGTAGTTTTGAGTGACCAAGAGACGCACCAGCAGCCCTC
12 L L L A L G P V V L S D Q E T H Q Q P S
961 CGCCACCAGCCCAGAAGACACGGAGCAGTGCGCCACCTGCGAGGTCCGGCAGCAGATTAA
32 A T S P E D T E Q C A T C E V R Q Q I K
1021 AACTATGCGATTAACGCGATAAAAATCTCAGATTTTGAGCAAAGTGCGAATGAAAGAAGC
52 T M R L N A I K S Q I L S K L R M K E A
1081 TCCTAATATCAGCCGAGATATAGTGAAGCAGCTCCTGCCAAAGCGCCGCGCTGCAGCA
72 P N I S R D I V K Q L L P K A P P L Q Q
1141 GCTTCTCGACCAGTACGACGTGCTGGGAGATGACAACAAGGATGTGGCTATGGAGGAGGA
92 L L D Q Y D V L G D D N K D V A M E E D
1201 CGATGAGCATGCCATCACGGAGACAATAATGATGATGGCCACTGAACGTAAGTTTTTAAT
112 D E H A I T E T I M M M A T E
1261 TTCGCATTGTTTTGGCATGATGAAAAGGACGTGCTCAGGCGTCTCCACAATAGGGGTTT
1321 TACGCACGGGGCAGAACGCACGGGAGACGCTGTCCACAAGCTTTATTTGACAACACGTAA
1381 CTTTACCGGGTTTTTGACATTGGAAATGTATCGATGTACCAACATTAACACGATTCAGAA
1441 CACTATACGGGTCCGGTGCATTTTGCCAGTCCAGCACGCGCGGTCATTACGCGCACGGACTG
1501 TTTTCTAAACTTTATTAGTCCACTTCCAGAGATCAAATGTCGTGTCAGGGGATGTTTGTTT
1561 ACACCAGTTTATTTCTGTCTGTAAATTTCAATCGCACATGGTCAGTATATAGAGAACCTT
1621 TGCTTTCTCTGTCTCTCCAGCCGAGTCCATCGTCCAGGTGGATGGGGAAACCAAAGTGC
127 P E S I V Q V D G E P K C
1681 TGCTTTTTCTCTTTTAATCAAAGTTTCAAGCCAATCGCATACTCCGGGCTCAGCTCTGG
140 C F F S F N Q K F Q A N R I L R A Q L W
1741 GTGTATCTGCGCCCGGCGGCCGAGGCGACCACCGTGTTCTGCAAATCTCCCGCCTGATG
160 V Y L R P A A E A T T V F L Q I S R L M
1801 CCGGTCACAGACGGGAACAGGCACATACGCATCCGCTCCCTGAAGATCGACGTGAATGCT
180 P V T D G N R H I R I R S L K I D V N A
1861 GGGGCCGGCTCTTGCAAAGTATAGACGTCAAACAAGTGTGACTGTGTGGCTGCGGCAG
200 G A G S W Q S I D V K Q V L T V W L R Q
1921 CCGGAGACCAACTGGGGCATCGAGATTAACGCCTTCGATTCGAGTGGAAATGACTTGGCC
220 P E T N W G I E I N A F D S S G N D L A
1981 GTGACCTCCGCAGAGCCTGGAGAGGACGGACTGGT GAGCTGAACCTTTATTTTACACTAA
240 V T S A E P G E D G L
2041 GCCTAAACTTTATGGTCAAGTTTTTTTTTACTATAAGTGATAACTAACAGTTTATTTTCATC
2101 AATAAACGTACAGGAGTGAATAGTGTGGTGGCATGTGTGCAGAGCTATTTACTGCAGCA
2161 TCTGGAATTTGACCATTACTACTATAGATTACAATAATTTGGACCATCCTGTAAGAAACAA
2221 AAACATTTCTTATATGTCCAGTTTCTAATTAGGTTCCAAAAAGCATGTTGGAATCTTTA
2281 TTGCACTGTCTGAGGTTTTAACTTTGGGCTTTATTGTGCAGGGAGGCTTTGCATAGTCA
2341 GCAGGGGGTTAAACATTCCTGCATTTCACTGCTGGAAGAGGGGAATCAAGATTTAAGACCT
2401 TTGAAAGTTGTTAATCAACACAGACTCCATGTATGCACACACCTGCATTTGGACAAATGC
2461 CCGGTCCACAATAACCTCAAATCTTATTGCTTGATTACATAAAAAGTTACCTGCCCCACA
2521 TTCCTGTGTGACTGTGCAAATCAGAGTAATTCCTGCAGGCACACACACTGCTACTATCA
2581 ATGACAAACACTTATCATAACGGCTCAAATACTGGCACCGGGCTCTGAGGCAATTATAATA
2641 CCTAGACGGCTGTGGATAACCAACCGTCATATGATTTAATTTCTTTAAAACCTCAAAGTT
2701 CATAATATTATCGTGCCATGTTTGAAAACCAGCTGCCAAAGGTCGAGGGCACCAGGATTA
2761 AAGATGTAACCCGAATGCTGTCATCCGCCTTTTTGCAAAGCAGCTATTTTCAAAGTAT
2821 TCACACATGCTCTGTCATTGCAGCAACCATTTCATGGAGGTGAAGATCTCAGAGGGCCCCA
251 Q P F M E V K I S E G P
2881 AGCGCGCCAGAAGAGACTCGGGCCTGGACTGTGACGAGAAGTCTCCAGAGTCCCGGTGCT
263 K R A R R D S G L D C D E N S P E S R C
2941 GCCGCTATCTGCTCACAGTGGACTTTGAAGACTTTGGCTGGGACTGGATTATTGCCCCAA
283 C R Y L L T V D F E D F G W D W I I A P
3001 AGCGCTACAAGGCCAACTATTGCTCCGGGGAGTGTGAGTACATGCACTTACAGAAGTACC
303 K R Y K A N Y C S G E C E Y M H L Q K Y
3061 CGCACACCCACCTGGTGAACAAGGCCAACCCAGAGGGACCGCAGGCCCTGCTGTACCC
323 P H T H L V N K A N P R G T A G P C C T
3121 CCACCAAGATGTCGCCCATCAACATGCTCTACTTTAACCGAAAAGAGCAGATCATCTATG
343 P T K M S P I N M L Y F N R K E Q I I Y
3181 GCAAGATCCCTCCATGGTGGTGGACCGTTGTGGATGCTCTTGAGTTG
363 G K I P S M V V D R C G C S *
←

□ E-box, I-box, CAAT box或TATA box; 黑体部分: 核心启动区
E-box, I-box, CAAT box or TATA box; Boldface: core region of promoter

— 起始密码 ~~~ 内含子 = 蛋白酶水解位点
Initiation codon Intron The conservatively hydrolytic site

* 终止密码 □ 保守的半胱氨酸残基
Termination codon The conservative cysteine residues

↪ C端生物活性区 ■ 信号肽
The bioactive carboxy terminal region The signal peptide

图2斑鳃肌肉生长抑制素结构基因及上游调控序列分析
Figure 2 Sequence analysis of myostatin structural gene and the 5' flanking region from Golden Mandarin Fish (*Siniperca scherzeri*)